

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 井上 明美



論 文 題 目

「TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines a  
subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable prognosis」

(口腔扁平上皮癌における p53/Fibrinogen 陽性癌は予後不良である)

指 導 教 授 承 認 印

高橋 博之



# 「TP53 positivity combined with high fibrinogen expression defines a subtype of oral squamous cell carcinoma with an unfavorable prognosis」

(口腔扁平上皮癌における p53/Fibrinogen 陽性癌は予後不良である)

氏名 井上 明美

## 【背景・目的】

口腔癌は、顎顔面口腔領域に発生する悪性腫瘍の総称であり、その 90%以上は扁平上皮癌(Oral Squamous Cell Carcinoma ; OSCC)である。国立がん研究センターがん統計によると本邦における口腔癌による死亡者数および罹患者数は、先進国の中で唯一増加傾向にあり、過去 30 年間で約 3 倍の増加を認めている。

口腔は、飲食物や喫煙による化学的刺激、補綴物や歯列不正による物理的刺激に慢性的に暴露されている器官であるため、発癌に係る特殊な環境と危険因子が常在的に複数存在することは他の器官と大きく異なる。口腔は直接観察できる唯一の消化器官であるため、異常を早期発見しやすいにもかかわらず口腔粘膜は炎症性上皮変化が常態的に存在するという特有の組織学的特徴を有する理由から、確定診断には極めて困難を要する。

FIB は肝臓で産生される血液凝固第Ⅰ因子であり、トロンビン作用によりフィブリンに変換されフィブリン血栓を形成する第二次止血作用を担う血漿タンパクである。近年、さまざまな悪性腫瘍において術前血漿フィブリノゲン(FIB)は高値を示し、血液凝固亢進は腫瘍進行を反映することが報告されているが、OSCC と術前血漿 FIB の臨床病理学的因子および予後との関連性についての報告は極めて少なく、特に病理組織検体を用いて FIB 検索を行った報告は現在までにない。

そこで本研究では、臨床検体を用い OSCC における FIB 陽性の臨床病理学的意義について検討した。さらに、FIB に加え免疫組織化学的診断マーカーである p53、p16、CK17、Ki-67 を用いて、OSCC の免疫プロファイルサブタイプ分類について検討した。

## 【対象】

2014 年～2016 年に北里大学病院耳鼻咽喉科にて施行された口腔領域手術症例 OSCC 82 例および非腫瘍性口腔疾患(non-T) 23 例、計 105 例。

## 【方法】

OSCC と non-T の術前血漿 FIB 値の比較を行った。次に OSCC 病理組織検体を用いて、FIB、p53、p16、CK17、Ki-67 の免疫染色を行った。FIB、p53、p16、CK17 は IHC score (陽性範囲スコアと染色強度スコアの積) を算出し、Ki-67 は腫瘍細胞 100 個中の陽性腫瘍細胞数を Labeling index (LIs) とし、OSCC と non-T の比較、臨床病理学的因子や予後との関連性、

術前血漿 FIB 値との相関性について検討を行った。また腫瘍間質における CD31 陽性血管内皮の確認による微小血管密度(MVD)、RNAscope assay による血管内皮増殖因子 *VEGF-A* mRNA 発現検索、RT-PCR による腫瘍細胞における *FGG* mRNA 発現検索、および腫瘍浸潤先進部の間質組織における出血スコア、炎症性細胞浸潤スコア、これらを合計した炎症スコア(I-score)を算出し、各スコアについて FIB IHC score Low/High との関連性を検討した。さらに FIB、p53、p16 の IHC score について階層型クラスター解析を行い、各種マーカー発現の予後的意義を評価した。

## 【結果】

### 1. OSCC における術前血漿 FIB 値は高値を示す

多くの悪性腫瘍において術前血漿 FIB は高値を示すという報告がある。そこで、OSCC 症例と non-T 症例における血漿 FIB 値の差異について臨床検査データを用いて検討した結果、術前血漿 FIB 値は、OSCC 患者が non-T 患者よりも有意に高値を示し、他の悪性腫瘍の報告と一致する結果であった。さらに臨床病理学因子との相関性については、術前血漿 FIB 値は、有意に腫瘍最大径・深達度を表す pT の進行および静脈侵襲(V)陽性の増加を示し、術前血漿 FIB 高値症例群は、低値症例群に比べて有意に全生存期間(Overall Survival; OS)の生存率が低く、予後不良であることが示された。

### 2. FIB IHCscore 高値症例は OSCC 予後不良である

OSCC 82 症例に対して、FIB IHCscore 評価を行った結果、FIB IHCscore 高値症例は、有意に臨床病期(stage)と pT の進行と、V の増加を示し、FIB IHCscore 高値症例は、低値症例に比べて有意に OS の生存率が低く予後不良であった。また、FIB、p53、p16、CK17 の IHCscore、Ki-67 Lis の各評価と血漿 FIB 値の相関性を評価した結果、FIB IHCscore のみが有意差を示した。このことから、腫瘍細胞における FIB IHCscore は、術前血漿 FIB 値を反映している可能性が考えられた。

### 3. FIB IHCscore は炎症強度および血管新生と相関する

腫瘍細胞増殖に伴い炎症、血管新生が生じる。そこで腫瘍細胞における FIB IHCscore と炎症・血管新生との相関性を検索した結果、FIB IHCscore 高値症例は、低値症例に比べて炎症スコア (出血スコア+炎症細胞浸潤スコア)および CD31 陽性 MVD が高値を示し、さらに *VEGF-A* mRNA が高発現であった。このことから腫瘍細胞における FIB IHCscore 高値群は、腫瘍の増殖や浸潤による炎症および血管新生を反映していることが考えられた。

### 4. IHC 免疫表現型による階層型クラスター解析

5 種のマーカー (FIB, p53, p16, CK17, Ki-67) について階層型クラスターリング解析を行ったところ、OSCC を免疫表現型の特徴から 4 群の免疫プロファイルサブタイプ (Immunoprofile subtypes ;[IPS] I-IV) に分類できた。

FIB IHCscore は、[IPS-II]で高値を示したのに対し、p53 IHCscore は、[IPS-I]および[IPS-II]で高値を示した。また p16 IHCscore は、[IPS-III]で有意に高値であった。CK-17 IHCscore、KI-67 L.I.はクラスタリンググループ間で異なる結果であった。したがって階層型クラスタリング解析にて最も相関性の高かった3種のマーカー (p53、FIB、p16)を用いて、[IPS-I]; p53 High / FIB Low、[IPS-II]; p53 High / FIB High、[IPS-III]; p53 Low / p16 High、[IPS-IV]; p53 Low / p16 Low に分類することができた。

#### 5. 階層型クラスタリングと OSCC 予後との相関性

階層型クラスタリング解析にて最も相関性の高かった3種のマーカー(p53、FIB、p16)における IPS と OS の相関性を Kaplan-Meier 法を用いて検討した。その結果、[IPS-II]; p53 High / FIB High が stage に関係なく最も有意に予後不良であることが示された。さらに、多変量 Cox 比例ハザード回帰では有意な相関性は認められなかったが、単変量 Cox 比例ハザード回帰により、[IPS-II]; p53 High / FIB High と、Stage、pT、pN、V、YK(Yamamoto Kohama)分類は、OSCC における有意な予後因子であった。

#### 【考察】

本研究では、IHC を用いた簡略化分類システムとして OSCC における予後不良サブタイプ分類を示すことができた。特に、OSCC [IPS-II]; p53 High / FIB High 症例は、stage とは無関係に有意に予後不良であることが示された。

OSCC における術前血漿 FIB 値と腫瘍細胞における FIB IHCscore は、fibrinogen  $\gamma$  chains である *FGG* mRNA との相関関係を認めなかったことから、mRNA レベルとは無関係に両者は高値を示しているといえる。さらに OSCC における FIB IHCscore 高値症例は、腫瘍細胞増殖に伴い炎症反応および血管新生が誘導されることにより、肝臓で産生された FIB が血管を介して腫瘍細胞に辿り着きやすい微小環境となっている可能性が高いと考えられる。

高 FIB 血症および腫瘍関連全身性炎症反応は、腫瘍進行および予後と有意な関連性を有することが既に認められており、今回の結果と一致している。しかし現在までに IHC を用いて腫瘍組織における FIB 陽性と悪性腫瘍の予後との相関性を検討した報告はほとんどない。さらに今回の報告は、OSCC における FIB と臨床病理学的因子および予後との相関性について IHC を用いて検討した最初の報告である。

今回の結果から、FIB は OSCC において臨床病理学的悪性度評価を行うための重要な因子であると考えられる。しかし臨床的应用につなげるためには、さらなる機能解析を含めた詳細な検討および多施設による大規模な研究が必要である。

#### 【結論】

OSCC を3種のマーカー(p53、FIB、p16)を用いて4群の免疫プロファイルサブタイプに分類することにより、OSCC の予後診断の精度向上につながった。この分類は OSCC における新たな診断法の確立に向けた分子基盤の構築となり得ると考えられた。